



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ **Offenlegungsschrift**
⑯ **DE 197 18 640 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 K 14/435
C 12 N 15/12
// G01N 21/64, C12Q
1/68

⑯ Aktenzeichen: 197 18 640.8
⑯ Anmeldetag: 2. 5. 97
⑯ Offenlegungstag: 22. 7. 99

⑯ Anmelder:
Wiedenmann, Jörg, 89231 Neu-Ulm, DE

⑯ Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

⑯ Anwendung eines orange-fluoreszierenden Proteins und weiterer farbiger Proteine und der zugehörigen Gene aus der Artengruppe *Anemonia* sp. (*sulcata*) Pennant, (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) in Gentechnologie und Molekularbiologie

⑯ Innerhalb der Artengruppe *Anemonia* sp. (*sulcata*) PENNANT wurden vier verschiedene farbige Proteine charakterisiert: ein orange-fluoreszierendes Protein, ein rotes, nicht-fluoreszierendes Protein und zwei grün-fluoreszierende Proteine. Die Charakterisierung erfolgte anhand von spektralen und biochemischen Eigenschaften. Stabilität, Molekulargewicht und spektrale Eigenschaften deuten auf eine Eignung dieser Proteine als Markersubstanzen in Gentechnologie und Molekularbiologie hin. Das Anwendungsgebiet der Proteine und der dafür codierenden DNA entspricht dem des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* (US-Patent 5491084) und erweitert dieses durch die Möglichkeit des Simultaneinsatzes der verschiedenen Proteine.

DE 197 18 640 A 1

DE 197 18 640 A 1

DE 197 18 640 A 1

Beschreibung

Anwendungsgebiet

5 Die Erfindung betrifft Protein und die zugehörigen DNA-Sequenzen entsprechend den Anspruch 1-7. Das Anwendungsgebiet entspricht dem des grün-fluoreszierenden Proteins (vgl. US-Patent 5491084, 1996). Hauptanwendung ist der Simultaneinsatz von grün- und orange-fluoreszierenden Proteinen.

Stand der Technik

10

Anwendung des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus Aequorea Victoria

(Nach CLONTECH, 1996; vgl. auch CHALFIE et al., US-Patent 5491084, 1996)

15 Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle Aequorea victoria wird als revolutionäres Reportermolekül gehandelt, da es aufgrund seiner Fluoreszenz-Eigenschaften ohne zusätzliche Co-Faktoren oder Substrate nur durch Bestrahlung mit UV- oder blauem Licht sichtbar gemacht werden kann. Dadurch werden Studien an lebenden Zellen möglich. Gereinigtes GFP ist ein 27-kDa-Monomer bestehend aus 238 Aminosäuren. Die Fluoreszenz ist stabil und Speziesunabhängig. Verwendet wird GFP und die codierende DNA wie folgt:

20 Zur Herstellung von Fusionsproteinen als Marker von Genexpression, Genaktivität und Proteinlokalisierung *in vivo*, *in situ* und in Echtzeit (CHALFIE et al., 1994; PRASHER et al.; 1992; INOUE & TSUJI, 1994; WANG & HAZELRIGHT, 1994).

Zum Studium von Zelllinien (CHALFIE et al., 1994).

Als Eichsubstanz für Spektrometer und FACS-Geräte (Fluorescence-Activatet-Cell-Sorter) (CLONTECH, 1996).

25 Für Mikroinjektionen in Zellen und Gewebe (CLONTECH, 1996).

Markierung lebender Organismen (z. B. Identifikation genmanipulierter Tiere) (PRASHER, 1995).

Weitere Anwendungen

30 GFP findet weitere Verwendung in physiologischen Studien als "Wellenlängentransformator" im Zusammenhang mit der Calcium-aktivierten Bioluminszenz (A. TREWAVAS zitiert von G. SEIFERT in "Die Zeit" vom 17.10.1996) Protein Engineering (nach STEIPE & SKERRA, 1997)

Durch Mutagenese des Wildtyp-GFPs wurden Mutanten mit sechsfach stärkerer Fluoreszenz erzeugt (S65T), sowie Mutanten die eine rot verschobene Anregung zeigen, wodurch eine simultane Analyse zum Beispiel zweier verschiedener

35 Promotoren in einer Zelle möglich geworden ist (CUBITT et al., 1995; HEIM et al., 1995; DELAGRAVE et al., 1995)

Stabilitätseigenschaften des grün-fluoreszierenden Proteins

(Nach STEIPE & SKERRA, 1997)

40

Die Fluoreszenz des GFP ist erstaunlich tolerant gegenüber Hitze (bis 65°C), Alkalien (pH 11), Detergenzien (1% SDS), Guanidiniumchlorid (6M), Fixierung mit Formaldehyd sowie vielen Proteasen, und es zeigt im Fluoreszenzmikroskop praktisch keinen Photobleicheffekt (CHALFIE et al., 1994; WANG & HAZELRIGHT, 1994). Diese Stabilität erklärt sich aus der Lage der fluorophoren Gruppe im Inneren des tonnenartigen Moleküls (β -Can) (Yang et al., 1996).

45

Bedeutung in der Literatur

(Nach STEIPE & SKERRA, 1997)

50 Schon ein Jahr nachdem CHALFIE et al. (1994) die Eignung von GFP als biologische Sonde zum Studium der Genexpression und der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen demonstrierten, wurden in einem Übersichtsartikel 36 experimentelle Anwendungen genannt (CUBITT et al., 1995).

Mehrere Veröffentlichungen in nahmhaften Zeitschriften wie "Nature" und "Science" u. a.

Ein komplettes Sonderheft der Zeitschrift "Gene" zum Thema GFP (Special Issue: Fluorescent Proteins and Applications, Gene 173, 1996).

Mehr als 100 Zitate bei einer aktuellen "Medline"-Suche im Internet.

Des Weiteren:

Populärwissenschaftliche Artikel (G. SEIFERT in "Die Zeit" vom 17. 10. 1996)

60

Wirtschaftliche Bedeutung

GFP und eine Vielzahl assoziierter Produkte werden von der Firma Clontech unter Lizenz der Columbia Universität weltweit vertrieben.

Clontech

65 ITC Biotechnologie GmbH

Postfach 103026

Tel.: 06221/303907

Fax.: 06221/303511

Heidelberg
e-mail. tech@itc-biotech.com
Columbia Innovation Enterprise
Columbia University
Engineering Terrace 363
New York, NY 10027
US-Patent 5491084, 1996

5

Nachteile des Stands der Technik

10

Schwierigkeiten beim Paralleleinsatz verschiedener GFP-Varianten

Aufgrund der nahe beieinander liegenden Emissions- und Anregungsspektren ist ein Paralleleinsatz der verschiedenen GFP-Varianten in der Praxis (vgl. 4.1) schwierig.

15

Molekülgröße

GFP ist mit einem Molekulargewicht von 27000 Da ein relativ großes Protein. Bei der Untersuchung der Proteinlokalisierung durch GFP-Fusionsproteine ist, vor allem bei kleinen Proteinen, mit einer Verfälschung der Ergebnisse durch das große Markerprotein zu rechnen.

20

Anregungsspektrum

GFP wird durch UV- und blaues Licht angeregt. In der Praxis wird meistens UV-Licht verwendet. Das energiereiche kurzwellige Licht ist stark zell- und DNA-schädigend. Dies stellt einen bedeutenden Nachteil für einen Stoff dar, der hauptsächlich für Untersuchungen in lebenden Zellen verwendet wird.

25

Aufgaben der Erfindung

Bezogen auf das orange-fluoreszierende Protein

30

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein fluoreszierendes Protein zur Verfügung zu stellen, das den bekannten GFP-Varianten hinsichtlich Stabilität und Anwendbarkeit ebenbürtig ist.

Es soll durch ein deutlich anderes Fluoreszenzspektrum auf verschiedenen Wegen einfach von den GFP-Varianten unterscheidbar sein und so einen Paralleleinsatz der verschiedenen Proteine möglich machen.

35

Es soll eine geringere Molekülgröße als die GFP-Varianten besitzen.

Es soll in einem Wellenlängenbereich anregbar sein, der Schädigungen von lebenden Zellen und DNA ausschließt.

Bezogen auf die GFP-Varianten

40

Die Aufgabe der Erfindung ist es, fluoreszierende Proteine zur Verfügung zu stellen, die den bekannten GFP-Varianten hinsichtlich Stabilität und Anwendbarkeit ebenbürtig sind.

Sie sollen durch ein anderes Fluoreszenzspektrum von den bekannten GFP-Varianten unterscheidbar sein und so einen Paralleleinsatz der verschiedenen Proteine möglich machen.

Sie sollen über ihren Aufbau zum Verständnis der Photophysik fluoreszierender Proteine beitragen.

45

Bezogen auf das rote Protein der Tentakel spitzen

50

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Protein zur Verfügung zu stellen, die den bekannten GFP-Varianten hinsichtlich Stabilität ebenbürtig ist.

Es soll über seinen Aufbau zum Verständnis der Photophysik fluoreszierender Proteine beitragen.

Es soll als Leitstruktur für die Herstellung eines rot-fluoreszierenden Proteins dienen.

Lösung der Aufgaben

55

Bezogen auf das orange-fluoreszierende Protein

Diese Aufgaben werden durch das orange-fluoreszierende Protein aus der Tentakelunterseite von *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *rufescens*) (Cnidaria; Anthozoa) gelöst. (vgl. Anspruch 1-7)

60

Bezogen auf die GFP-Varianten

Diese Aufgaben werden durch die grün-fluoreszierenden Proteine aus Tentakeln von *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *smaragdina*, var. *viridis* und var. *rufescens*) (Cnidaria; Anthozoa) gelöst. (vgl. Anspruch 1-7)

65

Bezogen auf das rote Protein der Tentakel spitzen

Diese Aufgaben werden durch das rote Protein aus den Tentakel spitzen von *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *rosea*,

DE 197 18 640 A 1

var. *smaragdina*, var. *viridis* und var. *rufescens*) (Cnidaria; Anthozoa) gelöst. (vgl. Anspruch 1-7)

Vorteile der Erfindung

5 Bezogen auf das orange-fluoreszierende Protein

Vorteile erwachsen aus der guten Eignung für einen Paralleleinsatz der fluoreszierenden Proteine. Im Gegensatz zu bekannten Methoden kann auf gut dokumentierbare Weise die Expression und Aktivität verschiedener Gene gleichzeitig untersucht werden. Dies gilt in selben Maße für Studien von Proteinlokalisation. Durch diesen Paralleleinsatz wird das

10 Studiengebiet drastisch erweitert und bisher nicht mögliche Untersuchungen werden machbar.

Aufgrund seines Anregungsspektrums ist das orange-fluoreszierende Protein ebenso wie das grün-fluoreszierende Protein in Kombination mit der Calcium-aktivierten Biolumineszenz in physiologischen Untersuchungen anwendbar. Vorteile erwachsen wiederum aus der Möglichkeit des Paralleleinsatzes der beiden Proteine.

15 Die geringere Molekülgröße von GFP ist bei der Herstellung von Fusionsproteinen von Vorteil, da das Fusionsprotein in der Größe dem zu untersuchenden Protein eher entspricht als beim Einsatz von GFP als Markerprotein.

Die erweiterten Möglichkeiten im Vergleich verschiedener Zelllinien, die der Paralleleinsatz von GFP und GFP bietet, lassen auf Fortschritte im Bereich der Tumorforschung hoffen.

20 Die Proteine können aufgrund ihrer deutlich unterschiedlichen Anregungsspektren gleichzeitig oder einzeln sichtbar gemacht werden. Eine getrennte visuelle Detektion der beiden Proteine bei gemeinsamer Anregung ist auch durch den Einsatz von Farbfiltern möglich, deren Transmissionsbereich mit dem jeweiligen Protein-Emissions-Spektrum übereinstimmt.

Eine weiterer Vorteil ist die höhere Thermostabilität von OFP. Sie bietet eine weitere Möglichkeit einer getrennten Detektion von OFP und GFP durch eine definierte Hitzeinwirkung, über die Fluoreszenz von GFP aus geschaltet werden kann während die OFP-Fluoreszenz bestehen bleibt. Darüberhinaus sind weitere Vorteile zu vermuten, z. B. bei Studien der Genregulation im Zusammenhang mit Hitzeschock-Promotoren.

25 Das orange-fluoreszierende Protein bietet Vorteile gegenüber dem grün-fluoreszierenden Protein, da es durch grünes Licht anregbar ist. Eine Bestrahlung mit Zell- und DNA-schädigendem kurzwelligem Licht wie bei Verwendung von GFP wird überflüssig. Dies ist zum Beispiel beim Einsatz in Zellkulturen von entscheidendem Vorteil.

30 Bezogen auf die GFP-Varianten

Die neuen GFP-Varianten bieten im Gegensatz zu den bekannten Varianten nicht die Vorteile des orange-fluoreszierenden Proteins, ein Simultaneinsatz mit den damit verbundenen Vorteilen ist dennoch denkbar. Darüberhinaus kann eine Aufklärung ihrer Struktur zum Verständnis der Photophysik der fluoreszierenden Proteine beitragen und ein gezieltes

35 Protein-Engineering ermöglichen.

Bezogen auf das rote Protein der Tentakelspitzen

Die Farbstabilität des roten Proteins deutet darauf hin, daß es ähnlich aufgebaut ist wie die fluoreszierenden Proteine.

40 Eine gentechnisch erzeugte rot-fluoreszierende Variante ist deshalb denkbar. Diese könnte ähnlich vorteilhaft sein wie das orange-fluoreszierende Protein. Daneben verspricht eine Strukturanalyse einen bedeutenden Erkenntnisgewinn bezüglich der Photophysik der fluoreszierenden Proteine.

45 Beschreibung der Erfindung

Erfindungshöhe

Beweisanzeichen für die erforderliche Tätigkeit sind die dringende Nachfrage nach solchen Stoffen, sowie die Überwindung von vergeblichen Bemühungen der Fachwelt einen entsprechenden Stoff herzustellen oder zu finden.

50 Die Erfindung fand während einer unbezahlten Diplomarbeit statt, die 1995/96 in der Abt. Ökologie/Morphologie der Tiere (Bio. III) der Universität Ulm angefertigt wurde. Arbeiten zur weitergehenden Charakterisierung des Moleküls wurden im Rahmen der Dissertation in der Abteilung Allgemeine Zoologie (Bio. I) der Universität Ulm durchgeführt.

55 Neuheit der Erfindung

In einem zusammenfassenden Artikel von G. SEIFERT über die Anwendung von GFP in "Die Zeit" vom 17.10.1996 wurde nur die Hoffnung geäußert, in Zukunft durch gentechnische Veränderung des GFP orange- oder rot-fluoreszierende Varianten zu erhalten.

Bei einer Internet-Recherche konnten nur Veröffentlichungen zum Thema "GFP" gefunden.

60 Fachleute der Universität Heidelberg, die mit GFP arbeiten, wußten nichts von der Existenz orange-fluoreszierender Proteine.

In meiner Diplomarbeit wird nur von der Entdeckung der farbigen Proteine berichtet, nicht aber von der technischen Anwendbarkeit.

65 Funktionsnachweis der Erfindung

Ein sicherer Funktionsnachweis kann noch nicht erbracht werden, da hierzu die für die Proteine codierende DNA vorliegen müßte. Eine Isolierung entsprechender Gene ist Gegenstand der derzeitigen Arbeit. Jedoch führt die Expression

DE 197 18 640 A 1

im Organismus und die abgebildete elektrophoretische Trennung in eindrucks voller Weise die Eignung der Farbstoffe für die genannten Anwendungsgebiete vor Augen (vgl. Abb. 13-17). Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen dem bereits in Anwendung befindlichen GFP und dem neuen Farbstoff OFP bezüglich Herkunft, Stabilität und Größe der Moleküle sind keine größeren Schwierigkeiten beim Einsatz zu erwarten.

5

Methoden

Herstellung von Rohextrakten

Methode 1

10

Für die Untersuchung der Fluoreszenz-Eigenschaften wurden kompletté Tentakel mit allen enthaltenen Farbstoffen in Puffer (6,25 mM Tris/HCl; pH7,5; 10% Glycerin) durch Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurden die Zellfragmente abzentrifugiert (15000 g; 4°C; 20 min) und der Überstand weiterverarbeitet.

15

Methode 2

Für Untersuchungen der Fluoreszenzstabilität wurde Gewebe in Anlehnung an Methode 1 in Puffer (6,25 mM Tris/HCl) aufgearbeitet.

20

Methode 3

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde das Gewebe in Anlehnung an Methode 1 in reduzierendem Probenpuffer (6,25 mM Tris/HCl; pH6,8; 10% Glycerin; 1% SDS; 200 mM Mercapto-Ethanol) aufgearbeitet.

25

Untersuchung der Fluoreszenz-Eigenschaften

Methode 4

30

Nach Methode 1 gewonnener Rohextrakt wurde im Fluoreszenz-Spektrometer untersucht.

Nach Methode 1 gewonnener Rohextrakt wurde im nativen Acrylamidgel (4%; pH6,8) aufgetrennt. Eine Erneuerung des Elektrodenpuffers (25 mM Tris/HCl, pH 6,8) erfolgte im Abstand von 30 min. Die fluoreszierenden Gelbänder wurden unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und in H₂O-bidest überführt um die Farbstoffe aus dem Gel zu lösen (20h; 4°C). Nach dem Abzentrifugieren der Gelreste wurde der Überstand im Fluoreszenz-Spektrometer untersucht.

35

Untersuchung der Stabilität

40

Nach Methode 2 gewonnener Rohextrakt wurde in Aliquote aufgeteilt. Diese wurden nach Methode 6-12 behandelt und anschließend im Fluoreszenz-Spektrometer untersucht. Da das rote Protein der Tentakelspitzen keine Fluoreszenz zeigt, wurde der Erhalt der roten Farbe als Kriterium der Stabilität gewählt.

45

Methode 6

1.2 ml Aliquote wurden in 2,5 ml Eppendorf-Gefäßen im vorgewärmten Thermoblock erhitzt. (65°C/5 min; 80°C/5 min; 95°C/2,5 min)

50

Methode 7

55

Stabilität gegenüber Detergenzien

Die Proben wurden mit SDS versetzt (Endkonzentration 1%).

Methode 8

60

Stabilität gegenüber pH-Extremen

Die Proben wurden mit HCl bzw. NaOH auf pH5,5 bzw. pH11 eingestellt

Methode 9

65

Stabilität gegenüber Harnstoff

Die Proben wurden mit Harnstoff behandelt (Endkonzentration 8M)

DE 197 18 640 A 1

Methode 10

Stabilität gegenüber Mercapto-Ethanol

5 Die Proben wurden mit Mercapto-Ethanol behandelt (Endkonzentration 200 mM)

Methode 11

Fällung mit Ethanol

10 Die Farbstoffe wurden durch Zugabe von zwei Teilen eiskaltem Ethanol gefällt. Nach Abzentrifugieren (15000 g; 4°C; 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in Puffer (6,25 mM Tris/HCl) gelöst.

Methode 12

15 Stabilität gegenüber lipophilen Substanzen

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 1 mit Mineralöl gemischt und geschüttelt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase untersucht.

20 Photographische Dokumentation

Fluoreszenz in Elektrophoresegelen und im lebenden Organismus wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) hervorgerufen und photographiert.

25 Bestimmung des Molekulargewichts

Methode 13

30 Aufreinigung von OFP

Nach Methode 3 gewonnener Rohextrakt wurde im 4%-Acrylamidgel (pH 6,8; 0,4% SDS) aufgetrennt. Eine Erneuerung des Elektrodenpuffers (25 mM Tris/HCl, pH 6,8; 1% SDS) erfolgte im Abstand von 30 min. Die orange-fluoreszierenden Gelbande wurde unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und in H₂O-bidest überführt, um den Farbstoff aus dem Gel zu lösen (20h; 4°C). Nach dem Abzentrifugieren der Gelreste wurde der Überstandvakuumgetrocknet.

Methode 14

40 Aufreinigung von GFP1/2

Die Farbstoffe wurden in Anlehnung an Methode 13 behandelt. Im Unterschied zu Methode 13 wurde dem Gel zusätzlich Harnstoff (2M) beigemengt.

Methode 15

45 Die durch Methode 13/14 gewonnenen Extrakte wurden mit reduzierendem Probenpuffer (6,25 mM Tris/HCl; pH 6,8; 10% Glycerin; 1% SDS; 200 mM Mercapto-Ethanol) versetzt und 6 min bei 95°C erhitzt. Die elektrophoretische Auf trennung erfolgte im 15%-Acrylamidgel (0,4% SDS). Im Anschluß wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

50 Methode 16

Vorbemerkung

Das GFP aus *Aequorea victoria* verliert im denaturierten Zustand seine Fluoreszenz, behält jedoch seine Absorptions-eigenschaften bei (CHALFIE et al., US-Patent 5491084, 1996). Dies gilt auch für GFP1/2 und OFP.

Nach Methode 3 gewonnener Rohextrakt wurde entsprechend Methode 15 behandelt. Es wurden große Mengen eingesetzt (ca. 150 µg Gesamtprotein pro Gelspur). Vor der Fixierung des Gels wurden die rötliche und die grünliche Bande durch Anschneiden des Gels markiert.

60 Ergebnisse

Untersuchung der Fluoreszenz-Eigenschaften

Das orange-fluoreszierende Protein

65 Die Untersuchung der Fluoresenzspektren des orangen-fluoreszierenden Farbstoffs aus der Tentakelunterseite von *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *rufescens*) (vgl. Abb. 13–14) ergab die in Tab. aufgeführten Daten (vgl. Abb. 1–4). Das Anregungsspektrum im Bereich über 600 nm läßt sich mit dem zur Verfügung stehenden Meßgerät nicht bestimmen.

Je nach Probe kann die Peak-Position um 1–2 nm von den angegebenen Werten abweichen.

Die Unterschiede im 1. Anregungsmaximum zwischen den nach Methode 1 und den nach Methode 5 aufgearbeiteten Proben sind wahrscheinlich auf Wechselwirkungen mit den grünfluoreszierenden Proteinen in den nach Methode 1 behandelten Proben zurückzuführen.

5

Tab. 1.

Spektrale Charakteristika der OFP-Fluoreszenz

Aufarbeitung nach	Anregungs- spektrum gemessen bei einer Emission von 650 nm	Anregungs-		Emissions- spektrum gemessen bei einer Anregung v. 540 nm	Emissions-	
		Maxima	Schulter		Maxima	Schulter
Methode 1	310- >600nm	363nm 574nm	ca.536nm	550-750nm	595nm	650nm
Methode 5	310- >600nm	337nm 574nm	ca.536nm	550-750nm	595nm	650nm

Vergleich OFP – GFP (S65T-His)

Ein Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren von OFP mit denen der bekannten GFP-Mutante S65T-His (HEIM et al., 1995) zeigt die Vorteile von OFP und die Eignung für einen Simultaneinsatz beider Proteine (vgl. Abb. 5–6)

25

Die grün-fluoreszierenden Proteine

30

Die Untersuchung der Fluoreszenzspektren eines Gemisches der grün-fluoreszierenden Farbstoffe aus *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *rufescens*-Tentakelunterseite; var. *smaragdina*-Tentakel; var. *viridis*-Tentakel) (vgl. Abb. 13–16) ergab die in Tab. aufgeführten Daten (vgl. Abb. 7–10)

Beweis dafür, daß es sich um ein Gemisch aus zwei Farbstoffen handelt, ist das variable Verhältnis der Emissionspeaks zueinander bei:

35

- A) Anregung bei verschiedenen Wellenlängen
- B) Bei unterschiedlichen Individuen einer Varietät
- C) Bei Proteaseverdau

40

Je nach Probe kann die Peak-Position um 1–2 nm von den angegebenen Werten abweichen.

Tab. 2

Spektrale Charakteristika der GFP-Fluoreszenz

45

Aufarbeitung nach		Anregungs- spektrum gemessen bei einer Emission von 550 nm	Anregungs-		Emissions- spektrum gemessen bei einer Anregung v. 440 nm	Emission- maxima
			Maxima	Schulter		
Methode 1 Methode 5	AS-GFP1	345-590nm	363/480nm	455nm	470-650nm	499nm
Methode 1 Methode 5	AS-GFP2	345-590nm	402/511nm	?	470-650nm	522nm

Vergleich AS-GFP1/2 – GFP (S65T-His)

60

Ein Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren von AS-GFP1/2 mit denen der bekannten GFP-Mutante S65T-His (HEIM et al., 1995) zeigt die Eignung für einen Simultaneinsatz beider Proteine (vgl. Abb. 11–12)

65

Das rote Protein der Tentakelspitzen

Die Tentakelspitzen von *Anemonia sulcata* PENNANT (var. *rufescens*; var. *smaragdina*; var. *viridis*, var. *rosea*) erhalten ihre Farbe durch ein rotes Protein. Dieser Farbstoff scheint im lebenden Tier zu fluoreszieren (vgl. Abb. 16). Im Homogenisat bleibt die rote Farbe erhalten, jedoch läßt sich keine Fluoreszenz spektrometrisch nachweisen.

Stabilität der farbigen Proteine aus *Anemonia sulcata* PENNANT

Die Proteine wurden nach den Methoden 6–12 behandelt. Die Ergebnisse sind in Tab. dargestellt. Sie geben den Prozentsatz der Fluoreszenz-Intensität (cps) an, der nach der Behandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Referenz gemessen wurde. Teilweise führte die Behandlung zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums. Die neue Peak-Position ist dann in Klammern angeführt. Im Fall des roten Proteins (RP) aus den Tentakel spitzen wurde der Erhalt der roten Farbe im Homogenisat als Kriterium gewählt und ist durch (+) oder (–) gekennzeichnet.

Tab. 3

10 Stabilität der Fluoreszenz / Farbe der farbigen Protein aus *Anemonia sulcata*

Behandlung	65°C / 5min	80°C / 5min	95°C / 2,5min	1%SDS	8M Harnstoff
OFP	100%	75%	20%	15%	79% (600nm)
AS-GFP1	90%	4%	1,5%	35% (502nm)	99%
RP	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Behandlung	pH 5,5	pH11	200mM Mer-capto-EtOH	EtOH-Fäl-lung	Mineralöl
OFP	30%	6%	90%	30% (592nm)	100%
AS-GFP1	35%	20% (509nm)	96%	34%	100%
RP	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

30 Molekulargewichte

Nach den Methoden 13 und 14 werden die farbigen Proteine nicht vollständig denaturiert. Die Fluoreszenz/Farbe bleibt erhalten. Auf diese Weise können die Farbstoffe im Gel detektiert werden. Es wurden scheinbare Molekulargewichte > 40000 Da ermittelt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Farbstoffe unter diesen Bedingungen als Oligomere vorliegen.

Nach den Methoden 15 und 16, durch welche die Proteine vollständig denaturiert werden, wurde für OFP ein Molekulargewicht von ca. 22000 Da ermittelt. AS-GFP1/2 besitzen ein Molekulargewicht von 27000 Da. Diese Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht bekannter GFP-Varianten deutet darauf hin, daß die verschiedenen Fluoreszenzspektren durch Austausch einzelner Aminosäuren in der Primärstruktur zustande kommen.

40 Das Molekulargewicht des RP im vollständig denaturierten Zustand wurde noch nicht ermittelt.

Zur Systematik von *Anemonia sulcata* (PENNANT) – Verbreitung; Varietäten; Vorkommen fluoreszierender Proteine

Vorbermerkung

45 Der systematische Teil ist ausführlich gehalten, um trotz bestehender Unklarheiten in der Literatur bezüglich der systematischen Stellung von *A. sulcata* eine sichere Zuordnung der fluoreszierenden Proteine zu bestimmten Varietäten/Arten zu ermöglichen.

50 Ökotypen

Anemonia sulcata (PENNANT) (Cnidaria; Anthozoa), die Wachsrose, ist eine häufige Bewohnerin von Hartböden in Atlantik und Mittelmeer. In der englischsprachigen Literatur wird das Tier unter dem Synonym *Anemonia viridis* (FORSKAL) geführt. Weitere Synonyme finden sich unter 2.3.4. Die Tiere beherbergen in ihrer Endodermis symbiotische Algen (Zooxanthellen). Der allgemeine Habitus wird von GOSSE (1860), ANDRES (1883) und SCHMIDT (1972) beschrieben.

55 SCHMIDT (1972) unterscheidet im Mittelmeer zwei Ökotypen: Tiere vom Ökotyp I besitzen bis 192 Tentakel und einen Fußscheibendurchmesser von 2–5 cm. Sie leben häufig in Kolonien. Ihre Verbreitung reicht bis in 5 m Tiefe. Ökotyp II besitzt ca. 192 Tentakel, häufig bis 384 und einen Fußscheibendurchmesser bis 15 cm. Die Tiere kommen solitär in Tiefen zwischen 3 und 25 m vor. WIEDENMANN (1996 und unveröffentlicht) fand Ökotyp I an einzelnen Standorten bis in 25 m Tiefe. Ökotyp II findet sich hingegen in wenig exponierten Habitaten schon ab 0,5 m Wassertiefe. Nach WIEDENMANN (1996 und unveröffentlicht) lassen sich die Tiere unter Berücksichtigung der Parameter Fußscheibendurchmesser, Frischgewicht, Tentakellänge, Mundscheibendurchmesser, Körperhöhe und Koloniebildung im Freiland (entspr. vegetativer Vermehrung) in drei Hauptgruppen einteilen. Tiere der Gruppen I und II entsprechen den bekannten Ökotypen I und II. Aufgrund ihrer Merkmalskombination werden die Tiere der Gruppe III einem neuen Ökotyp III zugeordnet (vgl. Tab. 1). Typ III fand sich bisher ausschließlich in Rockpools. Nach der gängigen Definition von SCHMIDT (1972) sind Tiere des Ökotyps III aufgrund der Tentakelzahl und der fehlenden vegetativen Vermehrung am ehesten Ökotyp II zuzuordnen.

Tab. 4

Charakterisierung der Ökotypen nach dem Habitus

Ökotyp	Fußsch. -Ø	Frischgew.	Tent.zahl	Tent.länge	Mundsch.-Ø	Körperh.	Kol.bild.
I	1,5-4,5 cm	5-50 g	40-190	3,5-7 cm	2,5-5,5 cm	2-4,5 cm	(+)
II	7-10 cm	125,3-297g	174-327	10-19 cm	6-9 cm	7,5-9 cm	(-)
III	3,5-5 cm	30-70g	264-348 cm	5-6,5 cm	5-6,5 cm	2,5-5cm	(-)

Farbvarietäten

Bereits 1860 beschreibt GOSSE Farbvarietäten der Wachsrose. Desgleichen nennt ANDRES (1881, 1883) verschiedene Varietäten. Bei diesen Beschreibungen wird teilweise GOSSE (1860) zitiert, teilweise werden Synonyme gebraucht. Darüberhinaus werden bestimmte Varietäten erstmals genannt. Eine Zusammenfassung dieser Arbeiten findet sich bei PAX (1962).

VALENTIN (1986) macht allein die Zooxanthellen für die Färbung der Tiere verantwortlich.

Eine Abhängigkeit der Farben von der Belichtung im Habitat bzw. vom unterschiedlichen Zooxanthellengehalt sieht SCHMIDT (1972).

WIEDENMANN (1996) konnte erstmals zeigen, daß sich die Tentakelfarbe aus zwei Komponenten zusammensetzt: Aus Brauntönen, die durch die Zooxanthellen hervorgerufen werden und aus Rot- und Grüntönen, die von genetisch fixierten Pigmenten des Tiers herrühren.

Die Rot- und Grüntöne der Tentakel werden durch zwei grün-fluoreszierende Proteine (AS-GFP1/2), ein orange-fluoreszierendes Protein (OFP) und ein rotes Protein (RP) im Cytoplasma der Ectodermiszellen des Tieres hervorgerufen. Die Lokalisation im Tentakel wird in Tab. 2 behandelt. Der subjektive Farbeindruck entsteht also aus einer Mischung der Proteinfarben und der Zooxanthellenfarben.

Die Intensität der braunen Grundfärbung ist stark variabel, da der Gehalt an Symbiontenpigment in hohem Maß von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig ist (WIEDENMANN; 1996). In ähnlichem Maße variiert die Konzentration der fluoreszierenden Proteine im Tiergewebe in Abhängigkeit von der Lichtqualität im Habitat (WIEDENMANN, unveröffentlicht). Diese neuen Untersuchungen zeigen, daß es sich bei den meisten beschriebenen Farbvarietäten um umweltbedingte Modifikationen von wenigen echten Varietäten handelt. Diese lassen sich nach dem Vorkommen der farbigen Proteine und der Zugehörigkeit zu einem Ökotyp gliedern (vgl. Tab. 5)

5
10
15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tab.2: Neugliederung von Farbvarietäten und Ökotypen von *Anemone sulcata*

Erstbeschreibung d. Varietät	Synonyme / Zitate	Farbe (n. vorne stehenden Autoren)			Ökotyp	Farb-Proteine	Typ	Lokalisation
		Körper	Tentakel	Tentakelspitze				
<i>var. rusticata</i> (Gosse, 1860)		matt braun	aschgrau	aschgrau	I, III	-		
	var. punicea (Gosse, 1860)	-	mahagonierot	mahagonierot	I, III	-		
	var. albida (Andres, 1880)	weiß	weiß	weiß	I, III	-		
	var. plumosa (Andres, 1880)	braun	braun	braun	I, III	-		
	var. rustica (Andres, 1883)	braun	braun	bleich	I, III	-		
<i>var. rosea</i> (Andres, 1880)		hellbraun	hellbraun	rot	I	RP;	Tentakelspitze	
	var. alabastrina (Gosse, 1860)	transparent oliv	wachsweiß	rosa	I	RP;	Tentakelspitze	
	var. splendida (Andres, 1880)	weiß	weiß	rosa	I	RP;	Tentakelspitze	
	var. vulgaris (Andres, 1883)	braun	braun	rot	I	RP;	Tentakelspitze	
	var. luteola (Andres, 1883)	braun; Acronagen goldgelb	braun	rot	I	RP;	Tentakelspitze	
<i>var. smaragdina</i> (Gosse, 1860)		Brauntöne	grün	karmiinrot-lila	I, II, III	A-GFP1/2; RP;	Tentakel Tentakelspitze	
	var. sulphurea (Gosse, 1860)	Brauntöne	zitronengelb; grüner Schimmer	lila	I, II, III	A-GFP1/2; RP;	Tentakel Tentakelspitze	
<i>var. viridis</i> (Andres, 1880)		-	grün	grün	III	A-GFP1/2; RP;	Tentakel	
	var. parva (Andres, 1880)	-	grün m. Flecken	weißen	-	?	(A-GFP1/2)?	?
	var. maculata (Andres, 1883)	-	grün m. Flecken	weißen	-	?	(A-GFP1/2)?	?
<i>var. rufescens</i> (Andres, 1883)		Brauntöne	grün m. Flamme z. Basis	roter Flecken	III	A-GFP1/2; A-OFP; RP;	Tentakeloberseite Tentakelunterseite Tentakelspitze	

Systematische Stellung von Farbvarietäten und Ökotypen

SAUER (1984, 1986) konnte nachweisen, daß es sich bei var. *vulgaris* und var. *rustica* um eigenständige Arten handelt, die er als *Anemonia sulcata* und *Anemonia rustica* bezeichnet. Eine Stellung als eigenständige Arten vermutet er auch bei anderen Farbvarietäten. Diese Klassifizierung ist meiner Meinung nach richtig, muß aber wahrscheinlich auf die verschiedenen Ökotypen ausgedehnt werden, so daß jeder Ökotyp einer Farbvarietät eine eigene Art darstellt. Nach dieser Sichtweise handelt es sich bei *Anemonia sulcata* (PENNANT) um eine Artengruppe mit mindestens acht Arten.

Allgemeine Verbreitung fluoreszierender Proteine

Das GFP ist innerhalb der Stämme Cnidaria und Ctenophora weit verbreitet und fand hauptsächlich im Zusammenhang mit Biolumineszenzerscheinungen Beachung (vgl. Morin 1974). Von Fluoreszenz innerhalb der Actinaria ist wenig bekannt. Allein TARDENT (1979) berichtet, daß die Tentakel von *A. sulcata* ein rötlches Leuchten bei Bestrahlung mit UV-Licht zeigen. Erste Sichtungen von Bildmaterial und Literatur deuten darauf hin, daß die in vorliegender Arbeit beschriebenen Proteine OFP, AS-GFP1/2 und RP in weiteren Spezies der Actinaria zu finden sind und bisher die Fluoreszenz-/Farberscheinungen aufgrund der fehlenden Lumineszenz übersehen wurden. Ein Vorkommen innerhalb anderer Ordnungen und Klassen der Cnidaria und Ctenophora ist ebenfalls wahrscheinlich.

Synonyma

Hier findet sich eine Sammlung von synonym gebrauchten Namen von *Anemonia sulcata* PENNANT, die nach Zusammenfassungen verschiedener Autoren erstellt wurde.

Nach ANDRES (1883):

1) *Urtica cinerea*: RONDELET (1554), lib. 17, cap. 16, p. 529.
Urtica secunda sive cinera Rondletii: GESNER (1560)
Urtica cinera Rondeletii: ALDROVANDI (1606), p. 567.
Urtica cinerea: JONSTON (1650), p. 72, t. 18.
Urtica marina saxo-innata: ALDROVANDI (1606), p. 568.
Urtica marina saxo-innata: JONSTON (1650), p. 72, t. 18.
Hydra tentaculis denudatis: GAERTNER (1762), p. 78, t. 1, f. 1.
2) *Priapus viridis* sp. n.: FORSKAL (1775), *Descript.*, p. 102, *Icones*, t. 27, f B. b.
Actinia viridis: GMELIN (1788-93), p. 3134; BRUGUIERE (1789), n. 13, t. 72, f 8. 9; BLAINVILLE (1830), p. 291, t. 32; BLAINVILLE (1834), p. 325; LAMARK (1837), p. 541. *Comactis viridis* (Forsk.): MILNE EDWARDS (1857), p. 236.
Actina viridis (Gmel.): GRAVENHORST (1831), p. 115.
Actina Enztacamea gracilis: H. & E. EHRENBERG (1834), p. 36.
Actina viridis (Gmel.): HOLLARD (1854), p. 633.
Actinia viridis (Forsk.): HELLER (1868), p. 17.
3) *Actinia sulcata* n. n.: PENNANT (1766); BRUGUIERE (1789), n. 10, t. 73, f 1,2; PENNANT (1812), p. 102.
Actinocereus sulcatus (Penn.): BLAINVILLE (1830), p. 294; BLAINVILLE (1834), p. 327
Gefurchte Seenessel: OKEN (1835), vol. 2, Part 1, p. 168; LAMARK (1837), p. 541.
Anemonia sulcata (Penn.): MILNE EDWARDS (1857), p. 233, t. 1, f 1. *Actinia sulcata* n. n.: PENNANT (1766); BRUGUIERE (1789), n. 10, t. 73, f 1,2; PENNANT (1812), p. 102.
Actinia sulcata (Penn.): TEMPLETON (1836), p. 303.
Anemonia sulcata (Penn.): FISCHER (1875), p. 5, p. 205, p. 1207; Id. p. 373.
Anemonia sulcata (Penn.): JOURDAN (1880), p. 25.
Anemonia sulcata (Penn.): ANDRES (1880), p. 312.
4) *Actinia cereus* (Ell.): ELLIS & SOLANDER (1786), p. 2.
Hydra cereus: GMELIN (1788-93), p. 3867.
Actina cereus (Ell.): RAPP (1829), p. 56, t. 2, f. 3.
Actinia Entacmaea Cereus: EHRENBERG (1834), p. 35.
Actinia cereus (Ell. & Sol.) (Hexastephanus): BRANDT (1835), p. 12.
Actinia cereus (Ell.): MARTENS (1838); GRUBE (1840), p. 11.
Anemonia cereus (Ell. & Sol.): GRUBE (1864), p. 106.
Anthea cereus: HASSALL (1841), p. 286.
Anthea cereus: TIIOMPSON (1841), p. 481; TIIOMPSON (1843), p. 284; TIIOMPSON (1856); TIIOMPSON (1858), p. 232.
Anemonia cereus sp. n.: CONTARINI (1844), p. 169, t. 16, 17, 18, f. a, b. 19.
Anemonia cereus (Cont.): VERANY (1846), p. 83; VERANY (1862), p. 98
Anthea cereus (Gaert.): COUCH (1838), III, p. 81, t. 14, f 2; CONCH (1841), p. 34; COCKS (1851), p. 10, t. 2, f 23, 27; JOHNSTON (1847), p. 240, t. 44
Actinia cereus: MILNE EDWARDS in CUVIER (1849); t. 61, f 1.
Anthea cereus (John.): MILNE EDWARDS (1851), p. 8.
Anthea cereus (Gaert.): LANDSBOROUGH (1852), p. 258.
Anthea cereus: GOSSE (1855), p. 27, f 37; GOSSE (1858), p. 416, GOSSE (1860), t. 5, f 2.
Anthea cereus: LEWES (1860), p. 17.

Anthea cereus: JORDAN (1855), p. 90.
 Anthea cereus (Actinia) (Ell. & Sol.). SARS (1857), p. 34.
 Anthea cereus (Ell.): WRIGHT PERCEVAL (1858), p. 120.
 Anthea cereus (John.): GRUBE (1861), p. 131 e p. 166.
 5 Anthea cereus (John.). JOHNSON (1861), p. 301, JOHNSON (1862), p. 180.
 Actinia cereus (Ell. et Sol.): HELLER (1868), p. 10.
 Actinia crassicornis (Lin.): DELLE CHIAJE (1825), v. 2, p. 228, 241, t. 16, f 4, BLAINVILLE (1830), p. 292; BLAINVILLE (1834), p. 326, DELLE CHIAJE (1841), v. 4, p. 125, v. 5, p. 137, t. 152, f 4, 9.
 6) Anemonia vagans sp. n.: RISSO (1826), p. 288; BLAINVILLE (1830), p. 292; BLAINVILLE (1834), p. 326;
 10 MILNE EDWARDS (1857), p. 234.
 Anemonia edulis sp. n.: RISSO (1826), p. 289, BLAINVILLE (1830), p. 292, BLAINVILLE (1834), p. 326.
 Actina flagellifera sp. n.: DANA (1849), t. 1, f. 1.
 Comactis flagellifera (Dana): MILNE EDWARDS (1857), p. 236.
 Entacmaea phaeochira sp. n.: SCHMARDA (1852), p. 16, t. 5, f 1, 2.
 15 Actinia phaeochira (Schm.): HELLER (1868), p. 11.
 Anthea gigantea sp. n.: (WEILAND), p. 38.
 Nach MANUEL (1988):
 Anemonia sulcata: STEPHENSON (1935), p. 124; CALGREN (1949), p. 50.
 Anemonia viridis (Forskal). MANUEL (1988), p. 102.

20

Literatur

Andres, A. (1881). *Mitth. Zool. Stat. Neapel* 2. Bd., Heft 3, S. 313–314.
 Andres, A. (1883). *Le Attinie*, in: *Atti R. Accad. lincei* (3. Mein. class. scienz. fis.) Tom. 14, S 211–674.
 25 Chalfie, M. et al. (1994). *Science* 263, 802–805.
 Chalfie et al. (1994). US-Patent 5491084, Feb. 13, 1996.
 CLONTECH, (1996). Clontech-Katalog 1995/96, ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995): *Trends Biochem. Sci.* 20, 448.
 Delagrange, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M., Youvan, D. C. (1995): *Bio/Technology* 13, 151–154.
 30 Gosse, P.H. (1860). *A Historie Of The British Sea-Anemones and Corals*, London: Van Voorst, Paternoster Row. 1860, p. 160–169.
 Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence, *Nature*, Vol. 373, Feb. 1995.
 Inoue, S. & Tsuji, F.I. (1994). *FEBS Letters* 341, 277–280.
 35 Manuel, R.L. (1988). *British Anthozoa, Synopsis of the British Fauna* (New Series), No. 18, E.J. Brill / Dr. W. Backhuys, Leiden; New York; København; Köln; 1988, S.102.
 Moosleitner, H.; Patzner, R. (1995). *Unterwasserführer Mittelmeer*, Edition Naglschmid, Stuttgart.
 Morin, J.G. (1974). *Coelenterate Bioluminescence in Muscatine*, L. and Lenhoff, H.M.; *Coelenterate Biology, Reviews and New Perspectives*. Academic Press, New York, 1974, S. 398–401.
 Pax, F., Müller, I. (1962). *Die Anthozoenfauna der Adria*, Fauna Flora adriat. (Split) 3, 1–343.
 40 Prasher, D.C. et al. (1992). *Gene* 111, 229–233.
 Prasher, D.C. (1995). Using GFP to see the light, *Trends in Genetics*, Vol. 11, No. 8, Aug. 1995
 Schmidt, H. (1972). *Prodromus zu einer Monographie der mediterranen Aktinien*, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
 Seifert, G. (1996). "Das Grün der Qualle", in "Die Zeit", 17.10. 1996.
 45 Steipe, B., Skerra, A. (1997). "Das grün fluoreszierende Protein" in Biospektrum, 1/1997, Spektrum (Akademischer Verlag), S. 28–30.
 Tardent, P. (1979). *Meeresbiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1979, S. 258–259.
 Titschack, von H. (1964). Untersuchungen über das Leuchten der Seefeder Veretillum cynomorium. *Vie Milieu* 15, 547–563.
 50 Valentin, C. (1986). *Faszinierende Unterwasserwelt des Mittelmeers*, Pacini Editore s.r.l., Pisa.
 Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994). *Nature* 369, 400–403.
 Wiedemann, J. (1996). Diplomarbeit, Universitätsbibliothek Ulm.
 Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N.Jr. (1996). *Nature Biotech.* 14, 1246–1251.

55

Patentansprüche

1. Proteine aus der Artengruppe *Anemonia* sp. (*sulcata*) PENNANT bzw. aus Arten, die mit Synonymen bezeichnet werden, dadurch gekennzeichnet, daß sie:
 - bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) orange fluoreszieren.
 - bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) grün fluoreszieren.
 - in den Tentakelspitzen vorkommen und diesen eine rote Farbe verleihen.
2. Proteine, unabhängig vom Herkunftsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß sie:
 - ein ungefähres Molekulargewicht von 22000 Da besitzen und in Puffer (6,25 mM Tris/HCl; pH7,5; 10% Glycerin) eine Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum zwischen 592–599 nm aufweisen und diese Fluoreszenz nach Hitzeeinwirkung (80°C/5 min in 1,2 ml Puffer (s. o.)) noch nachweisbar ist.
 - ein Molekulargewicht von 27000 Da besitzen und in Puffer (6,25 mM Tris/HCl; pH7,5; 10% Glycerin) eine Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum zwischen 497–500 nm bzw. zwischen 521–523 nm aufweisen.

DE 197 18 640 A 1

C) eine rote Eigenfarbe besitzen, die bei einer Fällung mit EtOH erhalten bleibt und nach Hitzeeinwirkung (80°C/5 min in 1,2 ml Puffer (s. o.)) noch nachweisbar ist.

3. DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß sie die unter einem der vorherigen Ansprüche genannten Proteine codieren.

4. DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch künstliche Veränderung einer der unter Anspruch 3 genannten Sequenzen erzeugt wurden.

5. Eine technische Anwendung eines Proteins bzw. einer DNA-Sequenz der in einem der vorherigen Ansprüche genannten Proteine oder Sequenzen gemäß US-Patent 5491084.

6. Eine simultane Anwendung mehrerer Proteine bzw. DNA-Sequenzen der in einem der vorherigen Ansprüche genannten Proteine oder Sequenzen gemäß US-Patent 5491084.

7. Eine simultane Anwendung eines oder mehrerer Proteine bzw. DNA-Sequenzen in Kombination mit den in US-Patent 5491084 beschriebenen Proteinen/Sequenzen.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

12.1 Abbildung 1-3

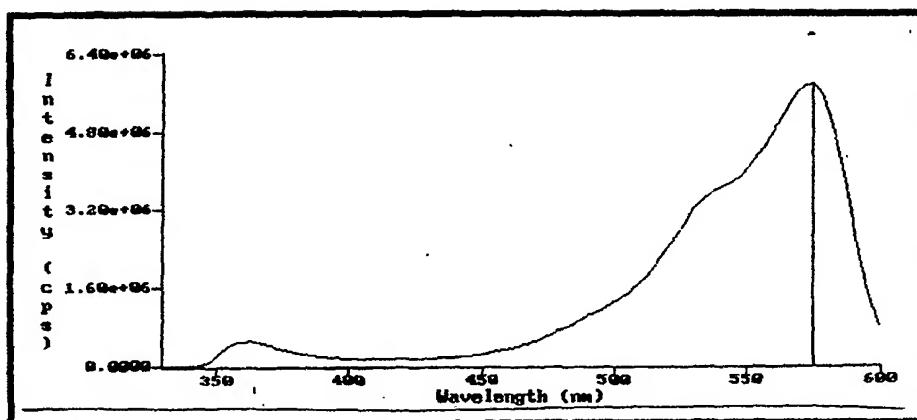


Abb.1: Anregungsspektrum von OFP (Aufarbeitung nach Methode 1)

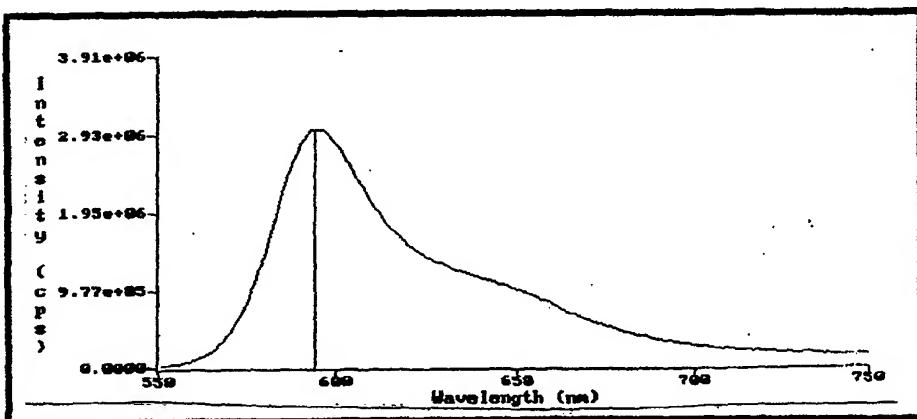


Abb.2: Emissionspektrum von OFP (Aufarbeitung nach Methode 1)

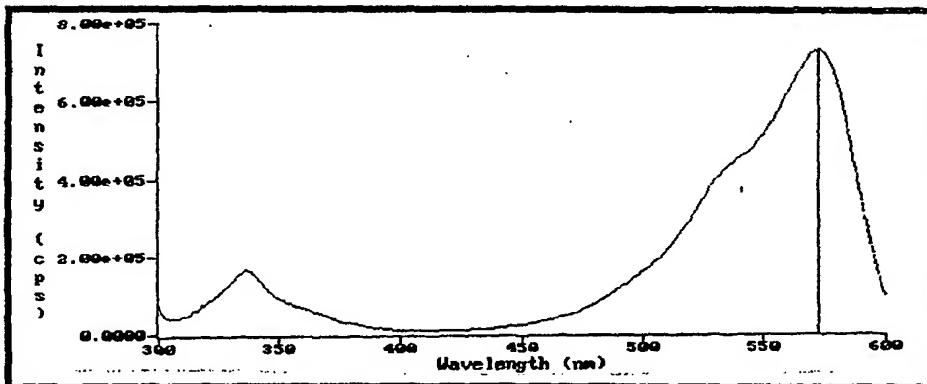


Abb.3: Anregungsspektrum von OFP (Aufarbeitung nach Methode 5)

12.2 Abbildung 4-6

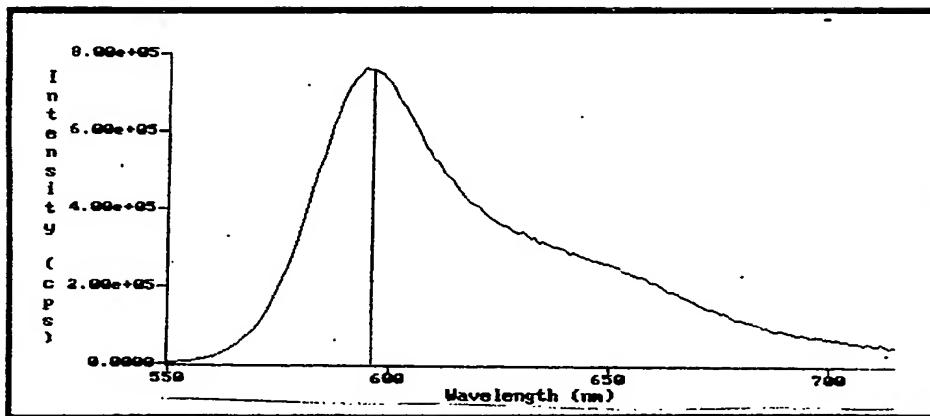


Abb.4: Emissionsspektrum von OFP (Aufarbeitung nach Methode 5)

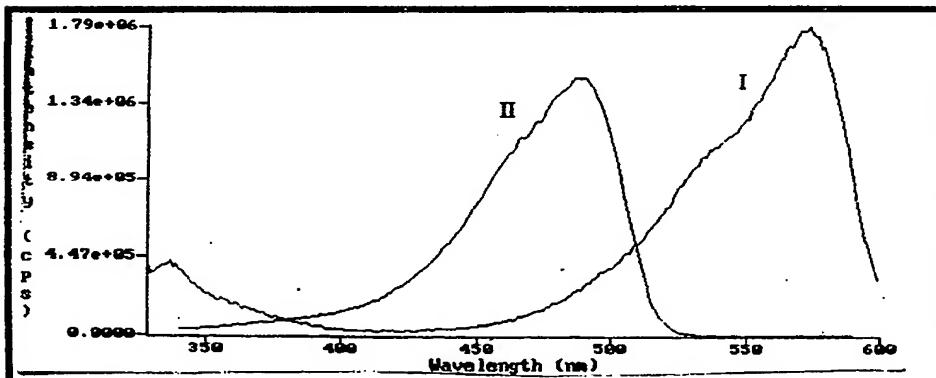


Abb.5: Anregungsspektrum von OFP (I) (Aufarbeitung nach Methode 5) und (S65T-His)-GFP (II)

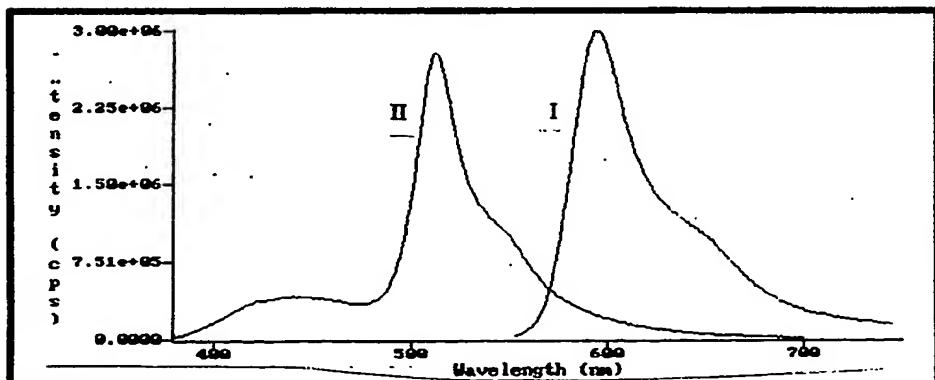
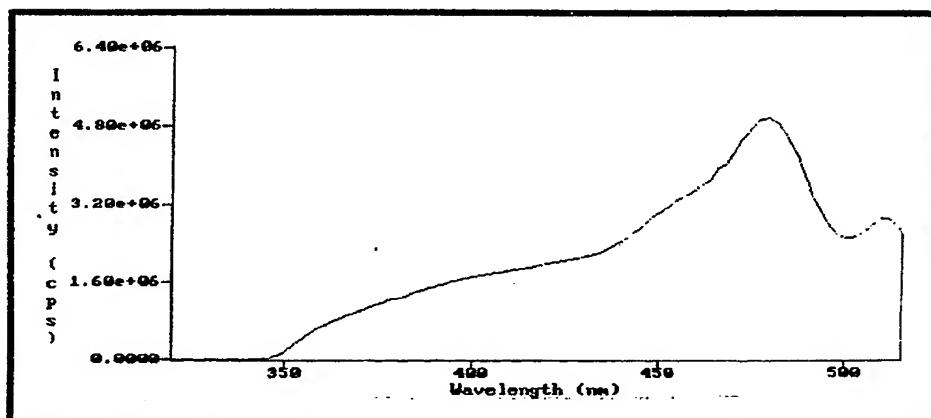
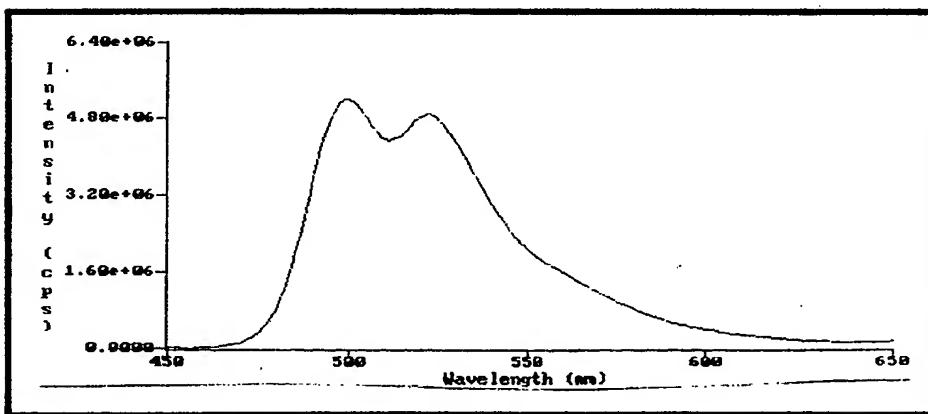
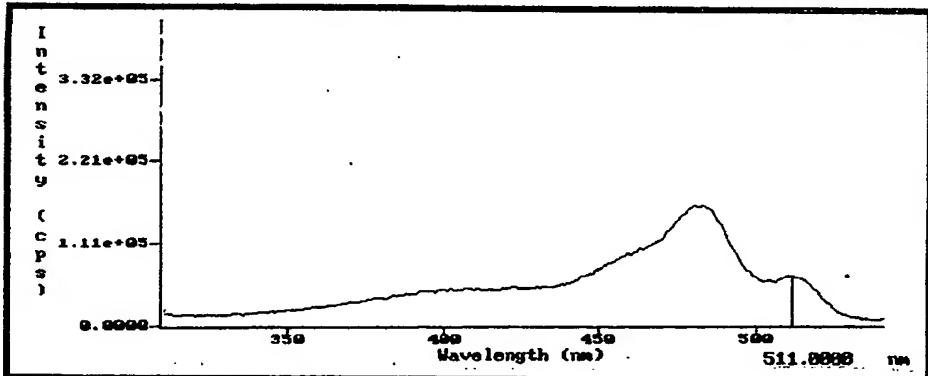


Abb.6: Emissionsspektrum von OFP (I) (Aufarbeitung nach Methode 5) und (S65T-His)-GFP (II)

12.3 Abbildung 7-9**Abb.7: Anregungsspektrum von AS-GFP1/2 (Aufarbeitung nach Methode 1)****Abb.8: Emissionsspektrum von AS-GFP1/2 (Aufarbeitung nach Methode 1)****Abb.9: Anregungsspektrum von AS-GFP1/2 (Aufarbeitung nach Method 5)**

12.4 Abbildung 10-12

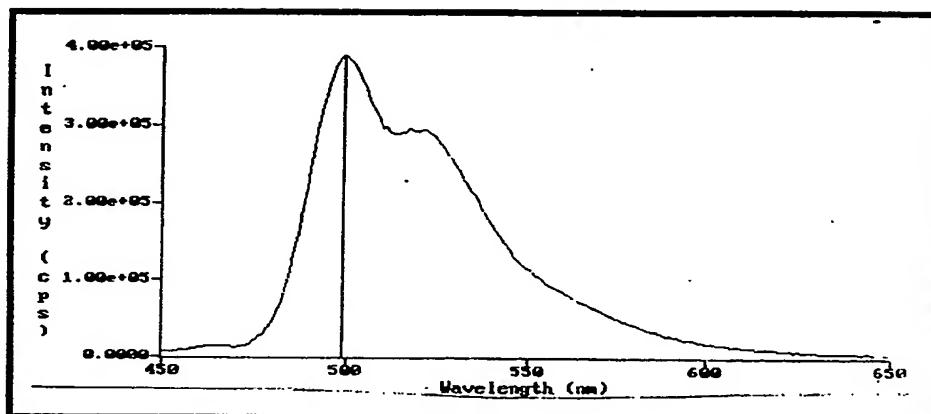


Abb.10: Emissionsspektrum von AS-GFP1/2 (Aufarbeitung nach Methode 5)

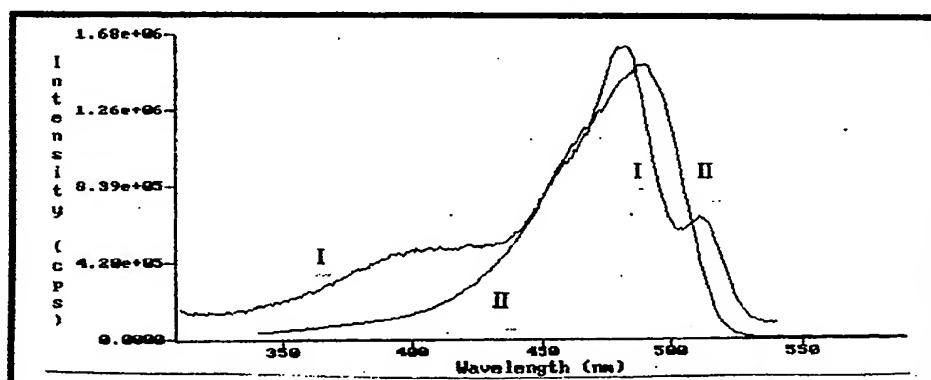


Abb.11: Anregungsspektrum von AS-GFP1/2 (I) (Aufarbeitung nach Methode 5) und (S65T-His)-GFP (II)

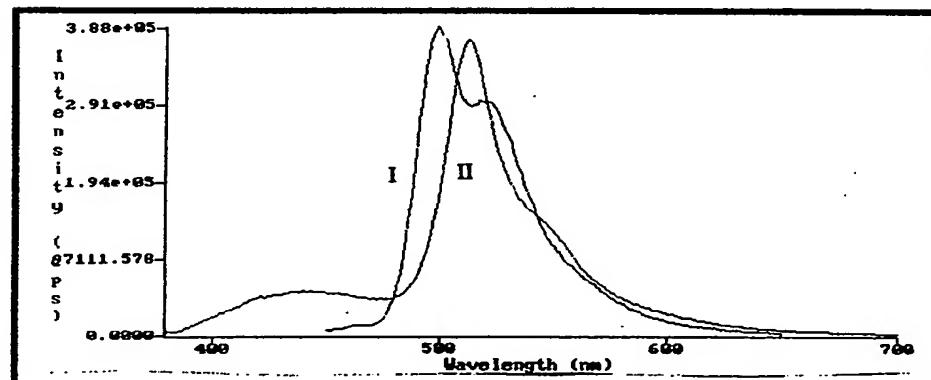


Abb.12: Emissionspektrum von AS-GFP1/2 (I) (Aufarbeitung nach Methode 5) und (S65T-His)-GFP (II)

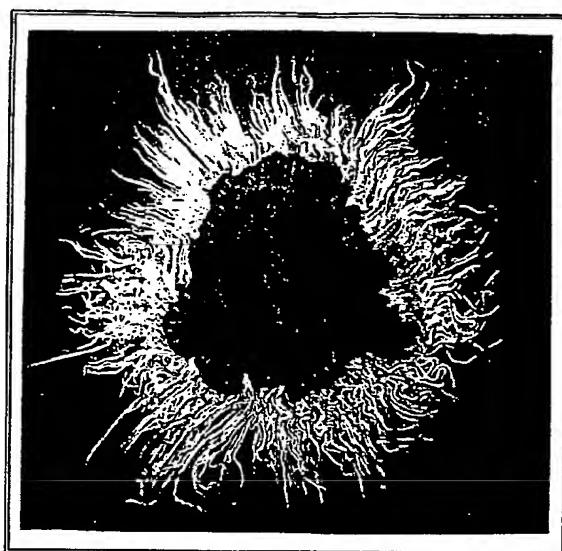


Abb.13: Tier von unten

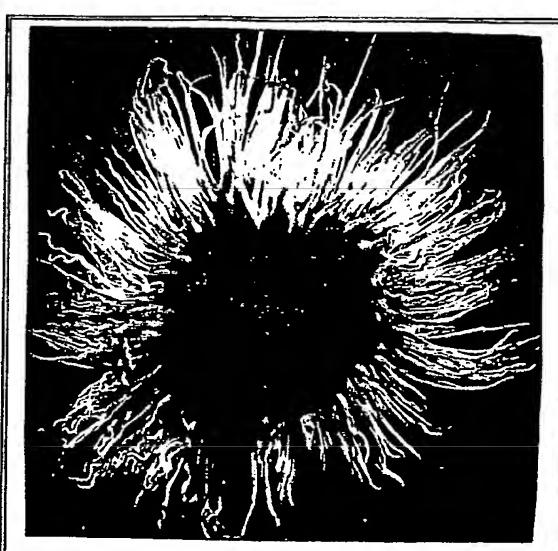
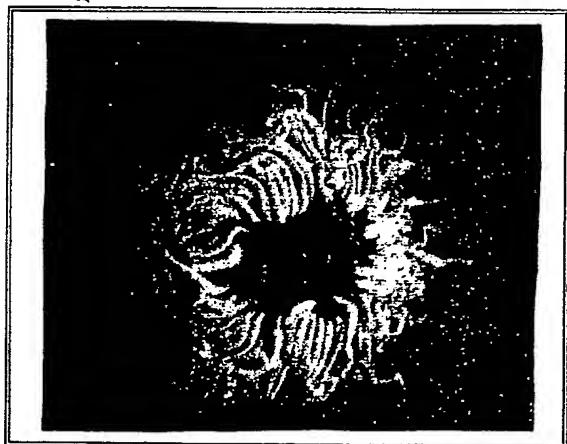
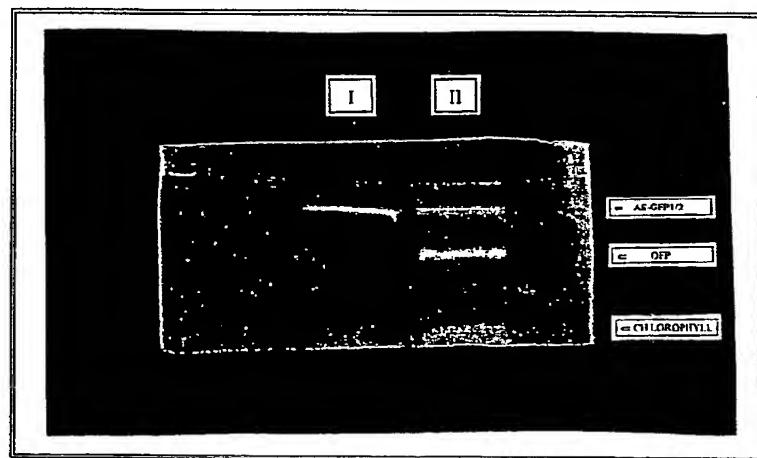
Abb.13/14: Vorkommen von OPP und AS-GFP1/2 in *C. sulcata* (var. *rufescens*), Beleuchtung m. UV (366nm)

Abb.14: Tier von oben

Abb.15: *C. sulcata* (var. *smaragdina*), Vorkommen von AS-GFP1/2 Beleuchtung mit UV (366nm)Abb.16: *C. sulcata* (var. *smaragdina*), Vorkommen des roten Proteins in Tentakel spitzenAbb.17: Auf trennung von Rohextrakten aus *C. sulcata* (var. *smaragdina*) (I) und *C. sulcata* (var. *rufescens*) (II) nach Methode 13. Beleuchtung mit UV